การประเมินสถานภาพของประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำว้าจังหวัดน่าน โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

วงศ์ปฐม กมลรัตน์[๑] และ อภิรดี หันพงศ์กิตติกูล[๒*]

[๑]สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

[๒]สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด

บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของปลาหมูงวง โดยวิเคราะห์พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอปลาหมูงวงจำนวน 384 โคลน พบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบจำนวน 27 ตำแหน่ง เป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์ที่มีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 7-35 ชุด สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ พบว่าไพรเมอร์ 5 คู่ (DTLBs7, DTLBs10, DTLBs20, DTLBs23 และDTLBs24) มีความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และนำมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและการประเมินสถานภาพของประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน จำนวน 3 ประชากรได้แก่ ประชากรปี 2545, 2550 และ 2551

ผลการศึกษาพบ ประชากรแต่ละปีมี ความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งมีค่าอยู่ระหว่าง 1 5-38 อัลลิล และจำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่งของประชากรปลาเท่ากับ 28 ประชากรปลาหมูงวงส่วนใหญ่มีความถี่ยีโนไทพ์เบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และพบค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีส่วนใหญ่มีค่าต่ำกว่าค่าคาดหมาย โดยมีค่าระหว่าง 0. 1026-0.9688 ขนาดของประชากรสืบพันธุ์มีค่าเท่ากับ 302.1, 198.5 และ 94.8 ตามลำดับ แนวโน้มการลดลงของขนาดประชากรสืบพันธุ์คิดเป็น 68.62 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลาเพียง 6 ปี และขนาดประชากรสืบพันธุ์ ณ ปี 2551 คิดมีจำนวนประมาณ 95 ตัวเท่านั้น การลดลงของประชากรสืบพันธุ์น่าจะมีสาเหตุจาก การจับขึ้นมาใช้ประโยชน์เกินกว่ากำลังผลิตของธรรมชาติ การปิดกั้นลำน้ำ และ สภาพแวดล้อม ที่เปลี่ยนแปลง จากผลการศึกษาข้างต้น รวมถึงข้อมูลพื้นที่การแพร่กระจายซึ่งจำกัดอยู่เฉพาะในแม่น้ำว้าเท่านั้น ทำให้ ปลาหมูงวงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติได้ง่าย ข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้สนับสนุนการจัดสถานภาพปลาชนิดนี้ให้อยู่ในสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ของไทย

คำสำคัญ: ปลาหมูงวง ปลาบง ปลาหมูน่าน แม่น้ำว้า ไมโครแซทเทลไลท์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ ขนาดประชากร

*ผู้รับผิดชอบ: อาคารปรีดาภรรณสูต ชั้น ๖ กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

โทร. ๐ ๒๕๕๘ ๐๑๔๘ e-mail: kunpagne@hotmail.com

Evaluation of genetic status and population structure of Black Lined botia (*Yasuhikotakia nigrolineata* Kottelat & Chu, 1987) in Wah river, Nan province using microsatellite DNA marker

Wongpathom Kamonrat [1] and Apiradee Hanpongkittikul[2*]

[1]Inland Fisheries Research and Development Bureau

[2]Inland Fisheries Resources Research and Development Institute

Microsatellite loci were characterized in Black lined botia (*Yasuhikotakia nigrolineata* Kottelat & Chu, 1987) random clones. Of 384 recombinant plasmids clones were sequenced and 27 of which contained microsatellites. Most of microsatellite isolated in this study contained dinucleotide core sequence with 7-35 times perfect repeats. Primer for DNA amplification using PCR were designed and synthesized for 10 loci. Five loci (DTLBs7, DTLBs10, DTLBs20, DTLBs 23 and DTLBs 24) were polymorphic loci and use to study genetic status and population structure on three year populations of Black lined botia (2003, 2007 and 2008 populations) from Wah river, Nan province.

The analyses indicated high levels of variability were observed at all loci with number of alleles per locus ranging from 15-38 with the average of 28 alleles. The exact tests suggested that most of genotype frequencies distorted from Hardy-Weinberg equilibrium. The observed heterozygosities were ranged from 0.1026-0.9688 and lower than their equilibrium expectations. Effective population sizes were 302.1, 198.5 and 94.8, respectively. The effective population sizes declined at approximately 68.62% in 6 years. The reduction of population sizes might be due in part to overfishing, blocking of the river and habitat changing. The results of this study together with the only distribution of this species in Wah river, Nan province supported the threatened status of this species as endangered categories of Thailand.

Key words: *Botia nigrolineata*, Wah river, microsatellites, DNA marker, effective population size

*Corresponding author: Preedakanasuta building Department of Fisheries Bangkok 10900

Tel. 0 2558 0178 e-mail: kunpagne@hotmail.com

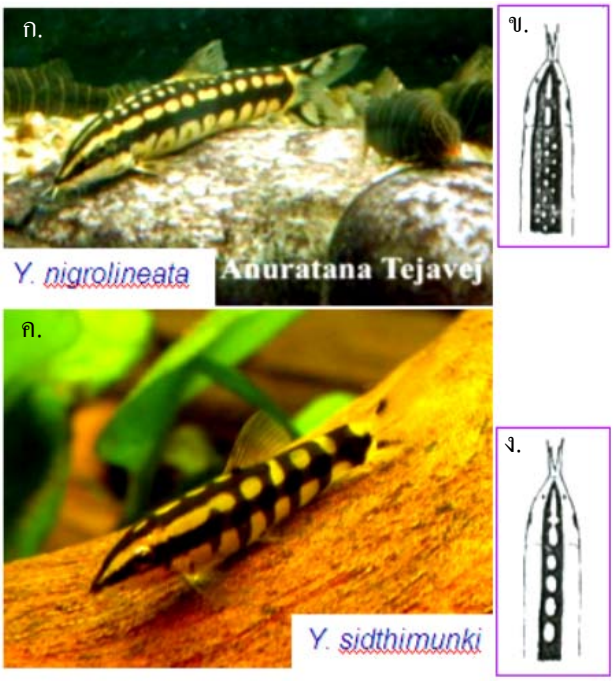
คำนำ

ปลาหมูงวง หมูน่าน หรือปลาบง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Yasuhikotakia nigrolineata* (Kottelat & Chu, 1987) ในประเทศไทยพบในลุ่มน้ำเจ้าพระยา เฉพาะบริเวณแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน โดยสภาพแหล่งน้ำที่พบเป็นต้นน้ำที่มีพื้นท้องน้ำเป็นแก่งหิน กระแสน้ำไหลตลอดเวลา และสามารถเก็บรวบรวมได้มากในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน (กิตติพงษ์ 2545) มีลักษณะเด่น คือมีแถบสีดำพาดตามแนวยาวของลำตัว 2 แถบที่บริเวณด้านหลังและด้านข้างของลำตัวตั้งแต่จะงอยปากจรดโคนครีบหาง ซึ่งทั้งสองแถบจะมีส่วนยื่นต่อกันเป็นช่วงๆ เกิดเป็นช่องว่างลักษณะเป็นดวงคล้ายลูกปัดเรียงต่อกัน (ธีรพล , 2545) ปลาหมูงวงมีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาหมูอารีย์ (*Yasuhikotakia sidthimunki* (Klausewitz, 1959) ที่พบในลำน้ำแม่กลอง (ภาพที่ 1) และ สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมได้ขึ้นบัญชีเป็นชนิดสัตว์น้ำที่อยู่ในสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ อย่างยิ่ง (critically endangered) ตามเงื่อนไขของ IUCN Redlist of Threatened Species (2001 Categories & Criteria version 3.1) (Vidthayanon, 2005) จึงทำให้ปลาหมูงวงเป็นที่นิยมในวงการปลาสวยงามและ ถูกจับขึ้นมาขายเป็นจำนวนมาก ประกอบกับ การแพร่กระจายของปลาหมูงวงในประเทศไทยจำกัดอยู่เฉพาะในแม่น้ำว้าเท่านั้น ทำให้ปลาหมูงวงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติได้ง่าย หากมีการจับขึ้นมาใช้ประโยชน์เกินกว่ากำลังผลิตของธรรมชาติ

การบริหารจัดการทรัพยากรปลาที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องมีข้อมูลของประชากรในช่วงเวลาหนึ่งๆ เพื่อติดตามดูการเปลี่ยนแปลง และติดตามแก้ไขให้ทันเหตุการณ์ในกรณีที่ประชากรเปลี่ยนแปลงในทางเสื่อมถอยลง เทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุลและหลักวิชาการพันธุศาสตร์ประชากร จะช่วยให้สามารถวิเคราะห์ถึงสถานภาพ และสภาวะของประชากร ได้เป็นอย่างดี และการศึกษาโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นเทคนิคที่ มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ กลุ่มประชากร สามารถบ่งบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม ความผันแปรทางพันธุกรรม และสามารถประเมินสถานภาพของประชากรปลาในธรรมชาติได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ข้อมูลเหล่านี้สามรถใช้ ประกอบในการจัดการบริหารทรัพยากร ปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า เพื่อให้มีการใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับปลาหมูงวง
2. ศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน
3. ประเมินสถานภาพของประชากรปลาหมูงวงเพื่อใช้เป็นข้อแนะนำในการบริหารจัดการประมงปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า

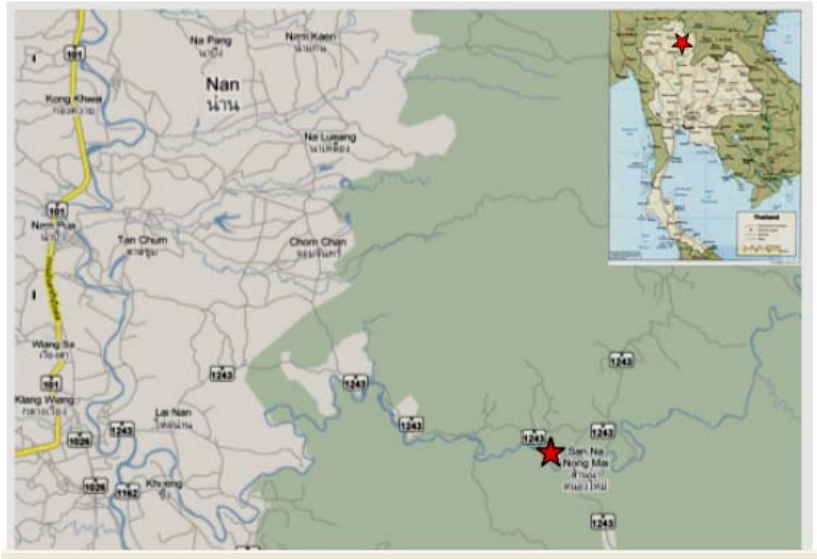


ภาพที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะเด่นที่แตกต่างกัน และการแพร่กระจายในประเทศไทยของปลาหมูงวง (ก. และข.) ซึ่งพบเฉพาะในแม่น้ำว้า จ.น่าน และปลาหมูอารีย์ (ค. และง.) พบในลุ่มน้ำแม่กลอง

ที่มา: ภาพ ก. และค. โดย ธีระพล เพชรพิพัฒน์ ภาพ ข. โดย Tejavej, A. และภาพ ง. โดย Gronhoj, K.

วิธีดำเนินการศึกษา

ก. การรวบรวมตัวอย่าง รวบรวมตัวอย่างปลา หมูงวงในพื้นที่แม่น้ำว้าและลำน้ำสาขาในจังหวัดน่าน (ภาพที่ 1) โดยใช้สวิง อวนตาถี่ (ขนาดช่องตา 1 ซม.) และซื้อจากผู้รวบรวมปลาในพื้นที่ รวบรวมตัวอย่าง 3 ครั้ง ในปี 2545 ปี 2550 และปี 2551 รวมจำนวนตัวอย่าง 1 35 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างสารพันธุกรรม โดยรวบรวมตัวอย่างครีบ และเนื้อเยื่อ เก็บรักษาไว้ใน เอทานอล 99.85% (absolute ethanol) โดยแบ่งแยกออกตามแหล่งตัวอย่าง และระยะเวลาที่เก็บ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ จนกว่าจะวิเคราะห์ตัวอย่าง และบันทึกข้อมูลของตัวอย่างในระบบฐานข้อมูล เพื่อควบคุมการเก็บฝากและสืบค้นของธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง



ภาพที่ 2 แผนที่ลำน้ำว้า และสถานที่เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาหมูงวง

ข. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การพัฒนาพีซีอาร์ไพรเมอร์

การพัฒนาไพรเมอร์สำหรับการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอของปลาหมูงวงดำเนินการตามวิธีเอ็นริชเมนท์ (Microsatellite-enriched libraries) ของ Billotte *et al.* (1999) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction)

ทำการตัดแบ่งส่วนของเนื้อเยื่อปลาหมูงวงจากตัวอย่าง 1 ตัว ตามปริมาณที่ต้องการ (ประมาณ 50 mg) บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด นำไปใส่ใน 10 ml extraction buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8; 250 mM NaCl; 1 % SDS และ 100 µg/ml Proteinase K บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม buffered phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 10 ml แล้วค่อยๆเขย่าให้เข้ากันเบาๆเป็นเวลาประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) 10 ml เขย่าเบาๆให้เข้ากันประมาณ 20 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นก็ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 95 % ethanol ที่เย็นจัด 20 ml โดยผสมกับส่วนใสที่ได้ หลังจากนั้นก็ทิ้งส่วนใสไปเหลือแต่ก้อนดีเอ็นเอ (ถ้าไม่เห็นก้อนดีเอ็นเอ ให้นำหลอดดังกล่าวนี้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -40 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้งด้วย 70 % ethanol 500 ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและปล่อยให้ตะกอนดีเอ็น

เอแห้งเอง จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย double distilled water 50 µl และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50-60 °C จนดีเอ็นเอละลายหมด

1.2 การตัดดีเอ็นเอ (DNA fragment preparation and Adaptor ligated)

นำดีเอ็นเอที่สกัดแล้วประมาณ 500 ng ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Tru 91 หรือ MseI และทำปฏิกิริยาการต่อปลายดีเอ็นเอด้วย MseI-Adaptor โดยเอนไซม์ T_4 ligase ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 7-8 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วนำดีเอ็นเอมาเจือจางโดยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultrapure water) ประมาณ 10-20 เท่า จากนั้นนำมาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยชิ้นดีเอ็นเอเริ่มต้นสามารถเกาะกับ adaptor ที่ต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ และจำทำการเพิ่มเบสที่ใช้ในการคัดเลือกเข้าไปด้าน 3'-end อีก 1 เบส

1.3 การเอ็นริชเมนท์ (Enrichment)

นำ biotinylated oligo SSR probes จำนวน 6 ชนิด คือ ($AG)_{10}$, $(TG)_{10}$, $(TAC)_{10}$,$(CAA)_{10}$,$(CAG)_{10}$ และ ($GAT)_{10}$ มาเชื่อมต่อที่ปลาย 5 ' ของ สายดีเอ็นเอที่เตรียมไว้แต่ละเส้น โดยก่อนทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ จะต้องนำแต่ละ biotinylated oligo SSR ใส่รวมกับ streptavidin Magnetic Sphere Paramagetic Particles (SA-PMPs) จำนวน 1 ml ซึ่ง streptavidin จะเข้าเกาะกับ biotin โดยมีปลายข้างหนึ่งติดกับ magnetic particle มีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 5X SSC 2 ครั้งโดยใช้ Magnetic Sphere Magnenic Separation Stands (MS-MSS) ซึ่งเป็นแท่งแม่เหล็กในการยึดเหนี่ยว biotinylated oligo SSR ที่เกาะอยู่กับ stripavidin เสร็จแล้วล้าง biotinylated oligo SSR ส่วนเกินทิ้งไปก่อน จึงนำส่วนที่ต้องการไป hybridize กับสายดีเอ็นเอต่อไป โดยปริมาณของ probe/DNA fragments ที่ใช้คือ 10 pmol/1.0 pmol. ในขั้นตอนการผสมต้องเพิ่มอุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วรีบวางบนน้ำแข็งทันที แล้งจึงค่อยผสมกันโดยปรับสภาพของปฏิกิริยาให้มีความเข้มข้นของ SSC ที่ 6 X อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับ melting temperature ของ probe โดย ($AG)_{10}$ และ $(TG)_{10}$ ใช้อุณหภูมิ 55 °C สำหรับ $(TAC)_{10}$, $(CAA)_{10}$, $(CAG)_{10}$ และ ($GAT)_{10}$ ใช้อุณหภูมิ 65 °C โดยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นประมาณ 10-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ทำการคัดเลือกเฉพาะดีเอ็นเอที่เกาะอยู่กับ strepavidin-biotinylated oligo SSR complex โดยใช้ MS-MSS ดึงให้ดีเอ็นเอที่ต้องการมาติดข้างหลอดแล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป หลังจากนั้นล้างด้วย low stringency solution ตามด้วย high stringency solution เพื่อกำจัดดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ต้องการบางส่วนที่ติดมาทิ้งและทำให้ดีเอ็นเอสะอาด จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจาก strepavidin-biotinylated oligo SSR complex โดยใส่ 0.15 N NaOH ตั้งวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นก็ใช้ MS-MSS ดึง strepavidin-biotinylated oligo SSR complex มาอยู่ข้างหลอดแล้วดึงของเหลวทั้งหมดมาใส่หลอดใหม่เพื่อทำให้เป็นกลางโดยเติม 1 N acetic acid และ TE buffer ลงไป หลังจากนั้นล้างดีเอ็นเอที่ได้ให้สะอาดโดยใช้ High Pure PCR isolation kit (Boehringer)

1.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Ampification)

ดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอน enrichment เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวซึ่งไม่สามารถนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดได้จึงต้องนำไปผ่านขั้นตอนพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ MseI (5'GAT GAG TCC TGA GTA ANNN3') (เพิ่ม PCR condition)ให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ แล้วจึงนำไปตกตะกอนด้วย 1/10 V. NaOAc pH 5.2 และ 2 V. 95% EtOH และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH 2 ครั้ง และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยผึ่งไว้ที่อุณภูมิห้องแล้วเติมน้ำเพื่อละลายและนำไปวัดปริมาณด้วย spectrophotometer

1.5 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (Library construction)

นำดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับ เวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega) ซึ่งมีขนาดประมาณ 3 kb ความเข้มข้น 50 ng/µl ในอัตราส่วน ดีเอ็นเอ : เวคเตอร์ คือ 3:1 โดยใน ปฏิกิริยา ทั้งหมด 10 µl ประกอบด้วยเวคเตอร์ pGEM-T Easy 25 ng, 2X Rapid Ligation buffer 5 µl, เอ็มไซม์ T4 ligase 3 weiss unit และดีเอ็นเอตามปริมาณที่คำนวณได้จากสูตร แล้วนำ ไปบ่ม ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นก็ ทำการ transformation ด้วยวิธี electroporation โดยใช้ *E. coli* strain DH10B เป็น host แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่เป็น selective madia (ampicillin 100 µg/ml, IPTG 100 µM และ x-gal 40 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน โคโลนีสีขาวแสดงว่ามีสายดีเอ็นเอแทรกอยู่ จึง นำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดย ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ primer M 13 โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้คือ 94 °C 3 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C 5 นาที 1 รอบ แล้วนำไปทำ electrophoresis เปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็น Blue colony และ molecular weight marker หลังจากนั้นก็เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวที่มี ดีเอ็นเอ ขนาดมากกว่า 500 bp ขึ้นไป เพื่อไป ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอต่อไป

1.6 การคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการใช้โดยวิธี Colony hybridization

โพรบ DIG-labeled oligo SSR ที่ใช้ประกอบด้วย $(AG)_{10}$, $(TG)_{10}$, $(TAC)_{10}$, $(TAT)_{10}$, (CAA), $(CAG)_{10}$, $(GAT)_{10}$ และ $(CCA)_{10}$ นำไปผสมกับดีเอ็นเอของแต่ละโคโลนีซึ่งผ่านการ lysis และ denature ให้อยู่บนแผ่น membrane filter ใน hybridization solution โดยใช้อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็ตรวจสอบผลโดยวิธี chemiluminescense detection (Boehringer) เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่ต้องการ

1.7 การหาลำดับเบส (Sequencing)

ทำการเลี้ยงโคโลนีที่ต้องการในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ amplicilin (100 µg/ml) 1 ml ที่อุณหภูมิที่ 37 °C ประมาณ 3-5 ชั่วโมง แล้ วนำ cell culture ที่ได้ไปทำพีซีอาร์ในปริมาณ 20 µl ประกอบด้วย 0.25 µM ของ M13 primer (Forward และ REverse), 100 µM dNTPs, PCR buffer (100

mM Tris-HCL (pH 9.0), 500mM KCL, 1.5 mM $MgCl_2$) และ 1 u Taq DNA polymerase และทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง GeneAmp^R PCR System 9700 (Applied Biosystems) โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้คือ 94°C 3 นาที 1 รอบ, 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72°C 5 นาที 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำ ผลที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค dye terminator cycle sequencing (Lee *et al,* 1997) และวิเคราะห์ผลด้วย ABI PRISM 377 DNA sequencer (PE biosystem)

1.8 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ทำการเลือกสายดีเอ็นเอที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอแต่ลำตำแหน่งจะต้องมีจำนวนของชุดเบสซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 6 , 4 และ 3 สำหรับได- , ไตร- และเตตระนิวคลีโอไทด์ตามลำดับ (Stalling *et al*., 1991) มาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมผ่านทาง http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi โดยกำหนดให้ส่วนที่เป็นไพรเมอร์อยู่ห่างจากส่วนที่เป็น SSR ประมาณ 30-50 เบส หรือในดีเอ็นเอบางสายสั้นกว่าแต่ต้องไม่สั้นกว่าความยาวของไพรเมอร์ และในบริเวณนั้นไม่พบเบสที่เรียงตัวซ้ำเกิน 3 ตัวโดยเฉพาะเบส A และ T ต้องมีค่า melting temperature อยู่ระหว่าง 55-65 °C ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบขั้นต้นควรมีคุณสมบัติ คือ มีปริมาณ GC content ในคู่ไพรเมอร์ไม่น้อยกว่า 50% หากเป็นไปได้ควรมีเบส C หรือ G ที่ปลาย 3'-OH ของคู่ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ได้จะต้องมีลำดับเบสที่ไม่เข้าคู่กับไพรเมอร์ด้วยกันเอง และมีความยาวประมาณ 18-28 bp (Innis and Gelfand, 1990)

1.9 การหาความเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR optimization)

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอและดีเอ็นเอปลาหมูงวงที่ได้ใช้ในขั้นแรก โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (5 µl) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอเริ่มต้น 20 ng, ไพรเมอร์ (Forward and Reverse) สายละ 0.25 pmol, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs และเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.2 unit หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องพีซีอาร์โดยกำหนดโปรแกรมดังนี้ 94 °C 3 นาที แล้วตามด้วย 35 รอบของ 94 °C 30 วินาที, อุณหภูมิในการ annealing (T_A) 30 วินาที และ 72 °C 1 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เติม loading dye (99% formamide, 10mM NaOH, 0.1% bormophenol blue, 0.1% Xylene cyanol FF) ปริมาตร 5 µl นำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรเรซีสบนอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) ในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ sequenceing gel apparatus (Biorad, USA) ขนาด 30x40 เซนติเมตร ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง และอ่านขนาดโดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (10bp DNA ladder; Invitrogen) หลังจากย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Cyber Gold®) และอ่านผ่านเครื่องอ่านเจล (FluorChem 8000, Alpha Innotech Corp.)โดยในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์ จะทำการทดสอบอุณหภูมิในการ annealing เป็นอันดับแรก หากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้

ไม่ชัดเจนจะทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนนี้ ถ้ายังไม่พบสภาวะที่เหมาะสมอีกจะทำการปรับเปลี่ยนปริมาณของ $MgCl_2$ และดีเอ็นเอต้นแบบ ตามลำดับ และทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม หากผลผลิตพีซีอาร์แสดงลักษณะเป็นโพลีมอร์ฟิค (polymorphism)

2. การศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในปลาหมูงวง

ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างครีบและเนื้อเยื่อของปลาหมูงวงจากแม่น้ำน่านและลำน้ำสาขาในจังหวัดน่าน โดยดัดแปลงจากวิธีการ "A Single Tube Rapid Extraction of DNA from Fish Blood" (Sambrook and Russell, 2001) วัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 ng/μL ก่อนนำไปวิเคราะห์ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ โดยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์ตามตารางที่ 2 แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟรเรซีสบนอะคริลาไมด์เจล 8 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide gel) ในบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้ sequenceing gel apparatus (Biorad, USA) ขนาด 30 x40 เซนติเมตร ที่ระดับกระแสไฟฟ้า 50 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง และอ่านขนาดโดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (10bp DNA ladder; Invitrogen) หลังจากย้อมเจลด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Cyber Gold®) และอ่านผ่านเครื่องอ่านเจล (FluorChem 8000, Alpha Innotech Corp.)

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

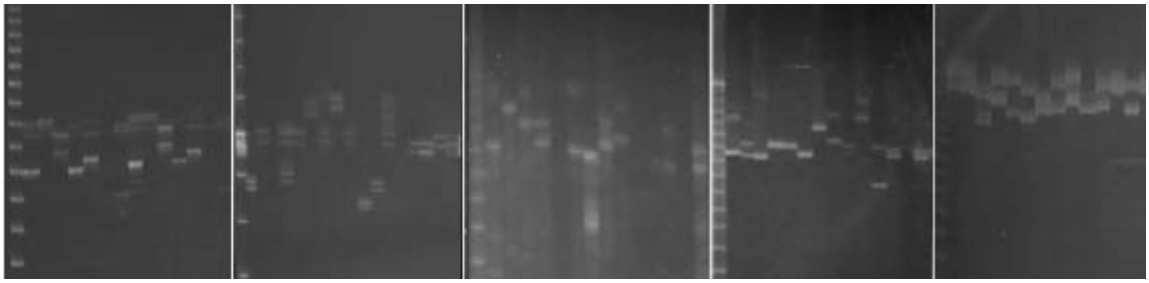
นำข้อมูลความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมา ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากร และวิเคราะห์ขนาดประชากรสืบพันธุ์ (effective population size) ตลอดจนความผันแปรของประชากร ตามวิธีการทางพันธุศาสตร์ประชากร เพื่อประเมินสถานภาพของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน และประเมินค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร ได้แก่ ค่าความถี่อัลลิล จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่า allelic richness และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) ด้วยโปรแกรม FSTAT (Goudet, 2001) พร้อมทั้งทดสอบมีความเบี่ยงเบนจากสมดุล ฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) และความแตกต่างระหว่างประชากร (populations differentiations) โดยการประมาณค่า exact *p*-value ด้วยวิธี Markov chain ตามวิธีการของ Guo and Thompson (1992) ในโปรแกรม GENEPOP Version 3.3 (Raymond and Rousset, 1995) และปรับระดับความน่าจะเป็น (*p*-value) สำหรับการใช้ข้อมูลชุดเดิมวิเคราะห์ซ้ำหลายครั้ง (multiple test) ด้วยวิธี Bonferroni correction (Hochberg, 1998; Rice, 1989) ทดสอบการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย จากค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) (Wright, 1978) โดยการประมาณค่า ตาม Weir and Cockerham (1984) ด้วยโปรแกรม FSTAT (Goudet, 2001) และประมาณขนาดประชากรสืบพันธุ์ (effective population size, Ne) โดยวิธี linkage/gametic disequilibrium (Hill, 1981) โดยใช้โปรแกรม NeEstimator (Peel *et al*., 2004).

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์สำหรับปลาหมูงวง

ผลการออกแบบไพรเมอร์ของปลาหมูงวงในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้ พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของปลาหมูงวงจำนวน 384 โคลน และพบโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบจำนวน 27 ตำแหน่งซึ่งทั้งหมดเป็นแบบไดนิวคลีโอไทด์ โดยมีจำนวนชุดซ้ำของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 7-35 ชุด และจากจำนวน 27 โคลนนี้สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 10 คู่ ซึ่งเมื่อนำไปตรวจสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ในปลาหมูงวงจากธรรมชาติ พบว่าไพรเมอร์ 5 คู่ (DTLBs7, DTLBs10, DTLBs20, DTLBs 23 และ DTLBs 24) แสดงผลที่เป็นโพลีมอร์ฟิค (polymorphic) ที่สามารถนำไปใช้ในการประเมินสถานภาพของประชากรปลาหมูงวงได้ (ภาพที่ 3)

ระดับความสำเร็จในการพัฒนาไพรเมอร์โดยวิธีการข้างต้นเท่ากับ 48.2 % (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จที่รายงานโดย Na-nakorn *et al*. (1999) และมีค่าสูงกว่าวิธีการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบดั้งเดิมซึ่งจะได้ positive clones ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเพียง 0.5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Billotte *et a.l*, 1999) สำหรับคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ได้ แต่ไม่ชัดเจน หรือเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะนั้น ได้ทำการปรับเพิ่มหรือลดอุณหภูมิในการ annealing ปริมาณ $MgCl_2$ และ/หรือปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบจนได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนขึ้น ในรายงานนี้ได้ทำการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์กับตัวอย่างประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ จำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการ annealing และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงในตารางที่ 2



DTLBs7 DTLBs10 DTLBs20 DTLBs23 DTLBs24

ภาพที่ 3 รูปแบบของอัลลิลในไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่งที่แสดงผลเป็นแบบโพลีมอร์ฟิค จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมูงวงธรรมชาติจากแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของการพัฒนา Microsatellite marker ด้วยวิธี Enrichment

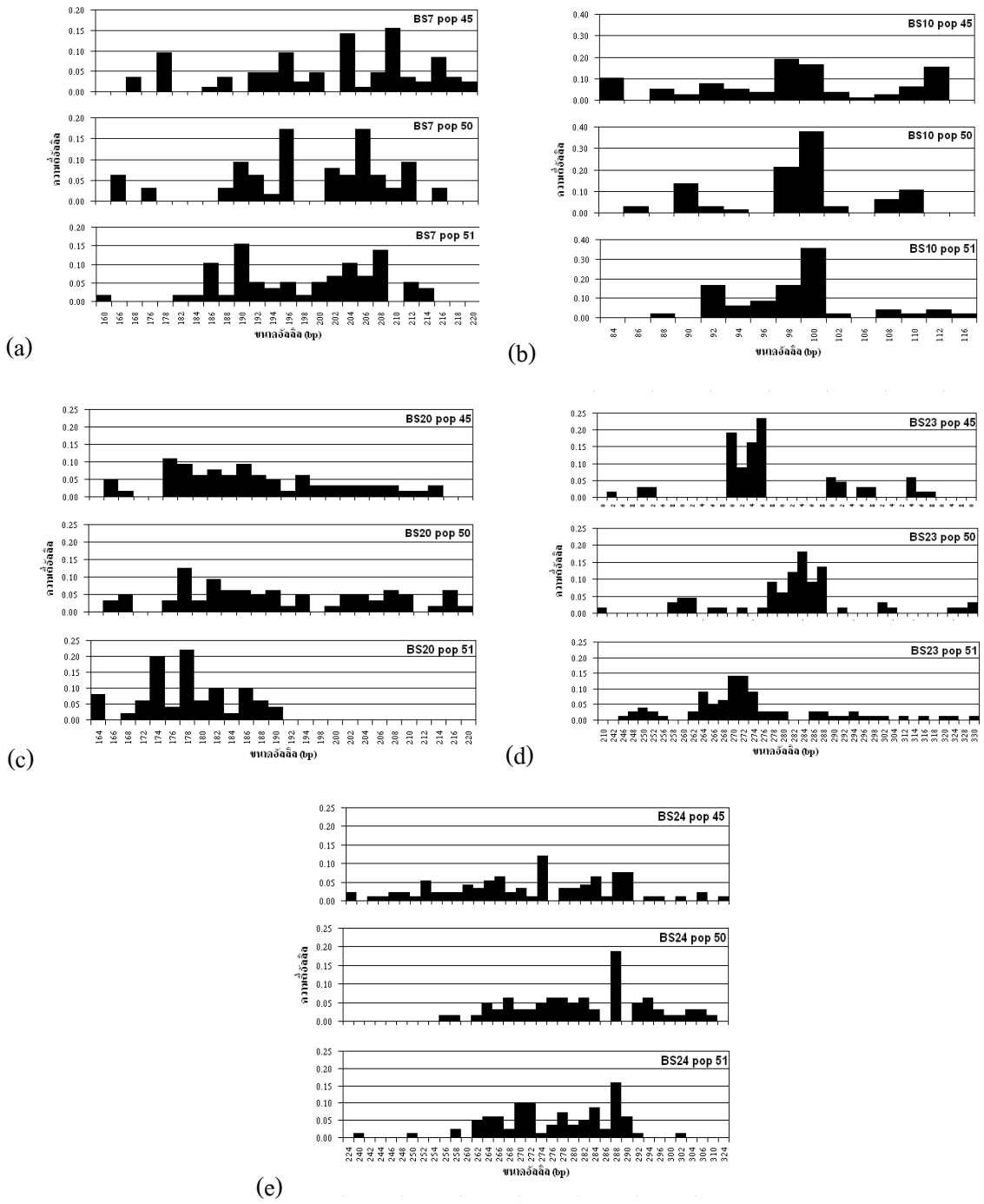
Total Clone	Positive clones (Colony hybridization)	% Clones		
		Positive	Microsatellite DNA	Primer
384	103	26.8 (103/384)	54.4 (56/103)	48.2 (27/56)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ จำนวนอัลลิลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการ annealing และส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Primer name	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ (5'-3')	ขนาดของผลผลิต พีซีอาร์ (bp)	Mean number of allele per locus	ลำดับเบสแกน (Core sequence)	PCR Conditions			
					Annealing Temperature (°C)	Number of Cycle (cycles)	Mg Conc (mM)	dNTPs (µM)
DTLBs 7	F: TTGCAGATTGTAGTGTCCGATTG R: CACTTTGATGAAGAGACCGTTTCAG	160-220 bp	16.67	$(CA)_{12}$	65	40	2.5	100
DTLBs 10	F: AGGGTGTTATTCTGCAACACTGC R: TTGAACTGAATTTGAATTGATCTGC	80-116 bp	14.00	$(GT)_{13}$	65	35	1.5	100
DTLBs 20	F: GTGACACTTCATACACCCCATGC R: CAGTCTTTTGTGTTTGTGTCTGCTG	164-214 bp	17.67	$(AC)_{27}$	65	35	1.5	100
DTLBs 23	F: TATTGGGATGAAAGCCTGTTGTG R: CTCCAGCTGCCACTATCAGAATC	232-330 bp	21.33	$(CA)_{9}$	60	35	1.5	100
DTLBs 24	F: AACGATCATGCCAATAAAGTTCC R: CGCGTGTGTTCTGTTTTACTCG	224-324 bp	26.67	$(GA)_{10}$	60	35	1.5	100

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน

ผลการวิเคราะห์ความผันแปรไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 5 ไพรเมอร์ คือ DTLBs7, DTLBs10, DTLBs20, DTLBs23 และ DTLBs24 กับตัวอย่างประชากรปลาหมูงวงที่รวบรวมจากแม่น้ำว้า จังหวัดน่านระหว่างปี 2545-2551 พบว่า ประชากรปลาหมูงวงในแต่ละปีมีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งในแต่ละประชากร มีค่าอยู่ระหว่าง 17.4 ถึง 19.2 อัลลิล ค่า allelic richness ของประชากรมีค่าระหว่าง 15.64 ถึง 16.79 โดยความถี่อัลลิลในแต่ละตำแหน่งและแต่ละประชากรปลาหมูงวงแสดงไว้ในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงความถี่อัลลิลของไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง Bs 7(a), Bs 10(b), Bs 20(c), Bs 23(d) และ Bs 24(e) ในประชากรปลาหมูงวง

ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี ของประชากรปลาหมูงวงมีค่า อยู่ระหว่าง 0.55-0.61 และเมื่อทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กและปรับค่าระดับนัยสำคัญการทดสอบด้วย Bonferroni correction พบว่าทุกประชากร มีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในลักษณะที่มีค่าเฮทเทอโรไซโกซีตีต่ำกว่าที่คาดหมาย (ตารางที่ 3 และ 4) ประชากรปี2551 มีความถี่ยีโนไทพ์อยู่ในสมดุลฮาร์ดี -ไวน์เบิร์ก เพียง 2 ตำแหน่งคือ BS20 และ BS23 และประชากรปี 2550 มีความถี่ยีโนไทพ์อยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก 1

ตำแหน่งคือ BS23 ในขณะที่ไมโครแซทเทลไลท์ในตำแหน่งที่เหลือมีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซโกตมากกว่าที่คาดหมาย สอดคล้องกับค่า F_{is} ซึ่งมีค่าเป็นบวกทุกประชากร โดยทั่วไปลักษณะเช่นนี้ในธรรมชาติอาจเกิดในประชากรที่มีขนาดเล็ก (Na-Nakorn *et al*., 2004) หรือเป็นประชากรผสมของประชากรย่อยที่เรียกว่า Wahlund effect (Hedrick, 1983)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างเฉลี่ยในแต่ละประชากร จำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่งค่า Allelic Richness ค่าเฉลี่ยค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตี และ ค่าคาดหมาย ค่า F_{is} และจำนวนประชากรสืบพันธุ์ (N_e) ของปลาหมูงวง 3 ประชากรจากแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน

Population	N	alleles per locus	Allelic Richness	H_e	H_o	F_{is}	N_e	Approx. 95% CI.
2545	56	19.2	16.79	0.92	0.55	0.409	302.1	107.5 to infinity
2550	36	17.4	16.00	0.90	0.61	0.332	198.5	91.2 to infinity
2551	43	17.6	15.64	0.90	0.57	0.375	94.8	55.7 to 207.5

ตารางที่ 4 แสดงการทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในประชากรปลาหมูงวง 3 ประชากร (Dememorization: 1000, Iterations per batch: 1000) ผลการทดสอบที่แสดงความแตกต่างทางสถิติระบุด้วยเครื่องหมายดอกจันหลังจากการปรับค่าระดับนัยสำคัญการทดสอบด้วยวิธี Bonferroni correction

Population	BS7	BS10	BS20	BS23	BS24
2545	<0.0001*	<0.0001*	0.0002*	<0.0001*	<0.0001*
2550	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001*	0.2189	<0.0001*
2551	<0.0001*	<0.0001*	0.3373	0.0197	<0.0001*

3. โครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน

ผลการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (genotypic differentiation test) พบว่า คู่ประชากรแต่ละปีมีความแตกต่างในความถี่ยีนที่ไมโครแซทเทลไลท์ 4 ตำแหน่งจากการทดสอบ 5 ตำแหน่งค่อนข้างสูง (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตาม ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient) (Wright, 1978) ของตัวอย่างปลาหมูงวงในปีที่ศึกษาพบว่า ค่าความผันแปรทางพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ระหว่างปีที่ศึกษา (F_{it}) มีค่าเท่ากับ 0.3924 (95% CI: 0.2230-0.5930) ซึ่งความผันแปรส่วนใหญ่ประมาณ 95% เกิดจากความแตกต่างภายในแต่ละปีที่ศึกษา (F_{is}= 0.3772; 95% CI: 0.2010-0.5810) ในขณะที่ความผันแปรระหว่างปีที่ศึกษามีค่าน้อยมากประมาณ 5% ของความผันแปรทั้งหมด (F_{st}= 0.0242; 95% CI: 0.0110-0.0420) แสดงถึง ตัวอย่างปลาในแต่ละปีที่ศึกษาน่าจะมีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติมากกว่าจะเป็นคนละกลุ่มประชากร

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรปลาหมูงวง 3 ประชากร (Dememorization: 1000, Iterations per batch: 1000) ผลการทดสอบที่แสดงความแตกต่างทางสถิติระบุด้วยเครื่องหมายดอกจันหลังจากการปรับค่าระดับนัยสำคัญการทดสอบด้วยวิธี Bonferroni correction

Populations	BS7	BS10	BS20	BS23	BS24
2545 & 2550	<0.0001*	<0.0001*	0.8429	<0.0001*	0.0087
2545 & 2551	<0.0001*	0.0263	0.0003*	<0.0001*	0.0045*
2550 & 2551	0.0031*	0.0002*	0.0003*	<0.0001*	0.0512

4. ขนาดประชากรสืบพันธุ์

ขนาดของประชากรสืบพันธุ์ในปี 2545, 2550 และ 2551 ประมาณค่า เฉลี่ยได้เท่ากับ 302.1, 198.5 และ 94.8 ตามลำดับ นั่นหมายถึง ประชากรที่มีศักยภาพทางพันธุกรรม หรือ ประชากรที่สามารถสืบพันธุ์และถ่ายทอดพันธุกรรมไปยังรุ่นลูก ณ ปี 2551 มีจำนวนประมาณ 95 ตัวเท่านั้น (ตารางที่ 3) แสดงถึงแนวโน้มที่ลดลงอย่างรวดเร็วคือลดลงประมาณ 3.18 เท่าหรือคิดเป็น 68.62 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลาเพียง 6 ปี FAO (1981) Franklin (1980) Nelson and Soule (1987) และ Frankham *et. al.* (2004) แนะนำว่าในประชากรธรรมชาติหากต้องการคงศักยภาพในเชิงวิวัฒนาการนั้น ขนาดประชากรสืบพันธุ์ควรมีขนาดเท่ากับ 500-5,000 เพื่อการปรับตัวและการพัฒนาในระยะยาว ซึ่งในกลุ่มประชากรที่ไม่ได้มีการจัดการนั้น ขนาดประชากรที่มีศักยภาพทางพันธุกรรมมักจะมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนประชากรที่พบเห็นมาก ซึ่งบ่อยครั้งจะมีจำนวนเพียง 1 ใน 10 เท่านั้น (Frankham *et. al*., 2004) นั่นหมายถึงว่าประชากรที่มีศักยภาพทางพันธุกรรมควรมีประมาณ 5,000-50,000 ตัว ซึ่งถือว่าประชากรปลาหมูงวงในธรรมชาติมีขนาดประชากรเล็กเกินกว่าที่จะหลีกเลี่ยงจากการเกิดการสืบพันธุ์เลือดชิด หรือการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมไปในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ลักษณะการลดลงของประชากรสืบพันธุ์ และจำนวนที่เหลือน้อยในการศึกษาปี 2551 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำว้ามีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อย่างมาก

5. สถานภาพและแนวทางการอนุรักษ์ปลาหมูงวงในลำน้ำว้า

การศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้า จังหวัดน่าน จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมในระหว่างปี 2545-2551 โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 5 คู่ที่พัฒนาขึ้นมาจากดีเอ็นเอปลาหมูงวง พบว่า ประชากร ปลาหมูงวงในแม่น้ำว้ามี ความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยความผันแปรส่วนใหญ่เกิดภายในประชากรแต่ละปี ส่วนความผันแปรระหว่างปีที่ศึกษามีค่าน้อยมาก นอกจากนี้ พบว่า ค่าสังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีของทุกประชากรมีค่าต่ำกว่าคาดหมายเมื่ออยู่ในสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก และในช่วงระยะเวลาที่ศึกษา 6 ปี ค่า สังเกตเฮตเทอโรไซโกซิตีและจำนวนอัลลิลต่อตำแหน่ง ที่พบมีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับขนาดประชากรสืบพันธุ์ที่

ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งปรากฏในปี 2551 มีจำนวนประมาณ 95 ตัวเท่านั้น ผลการศึกษาแสดงถึงความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำน่านเป็นอย่างยิ่งสอดคล้องการจัดสถานภาพ การถูกคุกคามใน ของปลาในประเทศไทย ซึ่งดำเนิน การประเมินโดยใช้หลักการจัดทำตาม Red List of Threatened Species (IUCN Ver. 3.1:2001) ของสหภาพสากลว่าด้วยการอนุรักษ์ (IUCN) ซึ่งปลาหมูงวงได้รับการจัดให้อยู่ในสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ (Vidthayanon, 2005)

อย่างไรก็ตาม การบริหารจัดการและการควบคุมการทำการประมงของปลาหมูงวงในแม่น้ำว้ายังไม่มีความชัดเจน ประกอบกับในแม่น้ำว้ามีการสร้างสิ่งกีดขวางลำน้ำประเภท ทำนบและฝายจำนวนมาก และตั้งแต่ปี 2549 มีการดำเนินการสร้างเขื่อนน้ำว้า ภายใต้แผน การพัฒนาแหล่งผลิตไฟฟ้าจากพลังน้ำขนาดเล็กซึ่งมีกำหนดแล้วเสร็จปี 2553 ซึ่งสิ่งกีดขวางลำน้ำเหล่านี้จะไปตัดเส้นทางอพยพย้ายถิ่น และอาจจะมีผลอย่างมากต่อโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรของปลาหมูงวง ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปลาหมูงวงในแม่น้ำน่านมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมภายในตัวอย่างประชากรแต่ละปีสูงมาก ประกอบกับประชากรมีการเบี่ยงเบนจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กในลักษณะที่มีค่าเฮทเทอโรไซโกซีตีต่ำกว่าที่คาดหมาย แสดงว่า ประชากรปลาหมูงวงในแม่น้ำน่านน่าจะมีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อย (subpopulation) จึงควรที่จะเร่งดำเนินการศึกษาโครงสร้างประชากรเชิงพื้นที่ (spatial genetic structure) ตลอดแม่น้ำว้าเพื่อนำมาใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ปลาหมูงวงในแม่น้ำว้าอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนั้น การประเมินสถานภาพความชุกชุม การเปลี่ยนแปลงความหลากหลายทางพันธุกรรม และขนาดประชากรสืบพันธุ์ ควรมีการ ดำเนินการ อย่างต่อเนื่อง โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างและขยายเขตพื้นที่ศึกษาให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการประมาณค่าต่างๆ และกำหนดมาตรการได้ถูกต้องทันต่อสถานการณ์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวิวัฒน์ ปรารมภ์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา นักวิชาการและเจ้าหน้าที่จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดน่าน ที่ช่วยเหลือในการรวบรวมตัวอย่าง และข้อมูลปลาหมูงวง ขอขอบคุณคุณวิชัย นิลคง ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลสภาพแวดล้อม และชุมชน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากกรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลการสร้างเขื่อนในแม่น้ำว้า

เอกสารอ้างอิง

กิตติพงษ์ จารุธาณินทร์. 2545. ตามรอย “หมูอารีย์” สัตว์สงวนแห่งสยาม. *Fish Zone* 3(4): 38-49.

ธีระพล เพชรพิพัฒน์. 2545. อนุกรมวิธานของปลาหมูสกุล Botia Gray, 1831 (Pisces: Cobitidae) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 133 หน้า.

วิชัย นิลคง ชุม ทองคำ บุญส่ง อินขาว และกฤติยา จิตอารี. 2545. รูปแบบการอนุรักษ์พันธุ์ปลาท้องถิ่นชุมชนลำน้ำว้า ตำบลน้ำพาง อำเภอแม่จริม จังหวัดน่าน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 128 หน้า.

อมรา คัมภิรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. บริษัทแท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

Billotte, N., Lagoda, P. J. L., Risterucci, A. M. and F. C., Baurens. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SST markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

FAO. 1981. Conservation of the genetic resources of fish: problems and recommendations. FAO Fisheries Technical Paper 217, Rome, Italy. 43p.

Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2004. A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press. 234 pp.

Franklin, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. Pp. 135–150. *In* Soule, M.E. & Wilcox, B.A. (eds.). Conservation Biology. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Galbusera, P., F. A. Volckaert, B. Hellemans and F. Ollevier. 1996. Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Ecology* 5: 703-705.

Gronhoh, K. 2010. http://www.israquarium.co.il/Fish/Botia/Botia.html. 26 พฤษภาคม 2553.

Guo, S.W. and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. Updated from Goudet (1995)

Hansen, M. M., J. B. Taggard and D. Meldrup. 1999. Development of new VNTR markers for pike and assessment of variability at di- and tetranucleotide repeat microsatellite loci. *Journal of Fish Biology* 55: 193-188.

Hedrick, P.W. 1983. Genetics of Populations, Science Books. 629 p.

Hill, W.G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genet. Res.* 38, 209-216.

Hochberg, Y. 1998. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75(4): 800-802.

Innis, M. A. and D. H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs, pp. 3-12. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds. PCR Protocols. Academic Press, New York.

IUCN. 2001. http://www.iucnredlist.org/static/categories_criteria_3_1, June 2009.

Kamonrat, W. 1996. Spatial genetic structure of Thai silver barb, *Puntius gonionotus* (Bleeker) populations in Thailand. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Dalhousie, Canada.

Kamonrat, W., N. Sukumasawin, S. Chausuan and S. Pannusa. 2008. Optimization of cross-specific microsatellite PCR primer for population study of *Cirrhinus microlepis* in the Lower Mekong Basin, pp 157-161. *In* Burnhill T. J. and Bamrungrach. P, eds. Proceeding of the 8th Technical Symposium on Mekong Fisheries, 15th -17th November 2006. MRC Conference Series No.7. Mekong River Commission, Vientiane.

Lee, L., Spurgeon, S. L., Heiner, C. R., Benson, S. C., Rosenblum, B. B., Menchen, S. M., Graham, R. J., Constaninescu, A., Upadhya, K. G., and J. M., Cassel. 1997. New energy transfer dyes for DNA sequenceing. *Bio Techniques* 24: 314-317.

McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright. 1995. Isolation of salmonids microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture* 137: 19-30.

Na-Nakorn, U., N. Taniguchi, E. Nugroho, S. Seki and W. Kamonrat. 1999. Isolatio and characterization of microsaterllite loci of *Clarias macrocephalus* and their application to genetic diversity study. *Fisheries Science* 65(4): 520-526

Na-Nakorn, U., W. Kamonrat and T. Ngamsiri. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from Introduced farmed *C. garipinus*. *Aquaculture* 240; 145-163.

Nelson, K. and Soulé, M. 1987. Genetical conservation of exploited fishes. pp.345–368. *In* Ryman, N. & Utter, F. (eds.). Population genetics and fishery management. Washington Sea Grant Program, Seattle.

Peel, D., Ovenden, J.R. and Peel, S.L. (2004). NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.

Raymond, M. and Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280-1283.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 34(1): 223-225.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2,100 pp.

Simsons, N.F., C. Moritz and B.W. Bowen. 1999. Population Identification. 8p. *In* K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois and M. Donnelly (eds.) Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No.4.

Tejavej, A. 2010. http://www.loaches.com/articles/telling-yasuhikotakia-sidthimunki-apart-from-y-nigrolineatus. 26 พฤษภาคม 2553.

Vidthayanon, C. 2005. Thailand red data: Fishes. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning. Bangkok, Thailand. 108 pp.

Wright, J. M. 1978. Evolution and the Genetic of Populations, Vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago. 590 pp.